

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
-Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Friesse

**Expression von Leptin und Peroxisomen Proliferations-  
aktivierten Rezeptoren in normalen und gestörten  
Schwangerschaften des ersten Trimesters**

**DISSERTATION**

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Mehmet Bastug**

aus

**Starnberg**

Jahr

**2010**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

**Berichterstatter:** PD Dr. med. Bettina Toth

**Mitberichterstatter:** PD Dr. med. Irene Schmid  
Prof. Dr. med. Werner Meier

**Betreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin:** PD Dr. med. Bettina Toth

**Dekan:** Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

**Tag der mündlichen Prüfung:** 17.06.2010

***Meinen Eltern, Hasan Ali und Türkan, und meinem Bruder Erkan  
gewidmet***

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
<b>ABC-Kit</b>	<b>Avidin-Biotin-Komplex-Kit</b>
<b>AIB3</b>	<b>Amplified in Breast Cancer 3</b>
<b>AK</b>	<b>Antikörper</b>
<b>CK7</b>	<b>Cytokeratin-7</b>
<b>DAB</b>	<b>3,3-Diaminobenidin</b>
<b>DAPI</b>	<b>4,6-Diamino-2-Phenylindol</b>
<b>et al.</b>	<b>und andere (et alii)</b>
<b>EVT</b>	<b>Extravillöse Synzytiotrophoblasten</b>
<b>Fa.</b>	<b>Firma</b>
<b>h</b>	<b>Stunde</b>
<b>H<sub>2</sub>O dest.</b>	<b>Destilliertes Wasser</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Wasserstoffperoxid</b>
<b>β-HCG</b>	<b>β-humanes Choriongonadotropin</b>
<b>IgG</b>	<b>Immunglobulin G</b>
<b>IL</b>	<b>Interleukin</b>
<b>IRS</b>	<b>Immunreaktiver Score (nach Stenger)</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilo Dalton</b>
<b>l</b>	<b>Liter</b>
<b>min</b>	<b>Minuten</b>
<b>ml</b>	<b>Milliliter</b>
<b>mRNS</b>	<b>Messenger Ribonukleinsäure</b>
<b>Na</b>	<b>Natrium</b>
<b>p.c.</b>	<b>post conceptionem</b>

#### **Abkürzungsverzeichnis**

---

<b>p.m.</b>	<b>post menstruationem</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung</b>
<b>PPAR</b>	<b>Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren</b>
<b>PPRE</b>	<b>Peroxisome proliferator response elements</b>
<b>RSA</b>	<b>Rezidivierende Spontanaborte</b>
<b>RT</b>	<b>Raumtemperatur</b>
<b>RXR</b>	<b>Retinoid X Rezeptor</b>
<b>SD</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>SSW</b>	<b>Schwangerschaftswoche</b>
<b>ST</b>	<b>Synzytiotrophoblasten</b>
<b>StGB</b>	<b>Strafgesetzbuch</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Tumornekrose Faktor-<math>\alpha</math></b>
<b>TZD</b>	<b>Thiazolidinedione</b>
<b>VT</b>	<b>Villöser Trophoblast</b>
<b>WHO</b>	<b>World health organization</b>
<b><math>\mu</math>l</b>	<b>Mikroliter</b>
<b><math>\mu</math>m</b>	<b>Mikrometer</b>

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 Übersicht und Zielsetzung.....	8
1.2 Definition des Aborts.....	9
1.3 Definition des Schwangerschaftsabbruchs.....	9
1.4 Definition der Blasenmole.....	10
1.5 Aufbau und Funktion der Plazenta.....	11
1.6 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR).....	13
1.6.1 PPAR $\alpha$ .....	13
1.6.2 PPAR $\beta/\delta$ .....	14
1.6.3 PPAR $\mu$ .....	14
1.7 Amplified Brustkrebs-3 Gen (AIB3).....	15
1.8 Retinoid X Rezeptor (RXR).....	15
1.9 Leptin.....	15
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 Untersuchungsmaterial.....	18
2.1.1 Aufbereitung der Paraffinschnitte.....	19
2.2 Methoden.....	19
2.2.1 Immunhistochemie.....	19
2.2.2 Lösungsansätze.....	21
2.2.3 Immunhistochemie: Färbeschema.....	22
2.2.4 Auswertung.....	23
2.2.5 Immunfluoreszenz – Doppelfärbung.....	24

<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>26</b>
3.1 PPAR.....	26
3.2 RXR und AIB3.....	29
3.3 Leptin.....	33
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>38</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>41</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>42</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>49</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>50</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>51</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Übersicht und Zielsetzung**

Der Erfolg einer Schwangerschaft ist abhängig von einer Vielzahl von physiologischen Prozessen. Störungen zu jedem Gestationszeitpunkt können zu einer Fehlgeburt führen, welche 25-50% aller Frauen betrifft (1).

Trotz bekannter Risikofaktoren wie Chromosomendefekte (in Abhängigkeit vom mütterlichen Alter), endokrine Störungen, anatomische Fehlbildungen sowie erworbene und hereditäre Thrombophilien, bleibt bei bis zu 50% der betroffenen Frauen die Ursachen der Fehlgeburt unbekannt (2). Daher ist das Ziel vieler Forschungsgruppen, neue Risikofaktoren zu untersuchen und somit neue Diagnose- und Therapiemöglichkeiten zu etablieren (3).

Leptin und Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) sind zwei wichtige Faktoren, welche bei der Regulation des Energiestoffwechsels eine Rolle spielen (4), (5), (6), (7). Aktuelle Studien legen eine mögliche Rolle im Foeten bei immunregulatorischen Prozessen (8), (9), Unterdrückung der Produktion von inflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukinen (IL) und Tumornekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) (10), (11), (12), (13), (14), Induktion einer terminalen Differenzierung, Zellzyklusarrest, Apoptose und nicht apoptotischem Zelltod (15), (5), (16), (17) nahe. Derzeit existieren keine Daten über das Expressionsmuster von PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta/\delta$ , Retinoid Rezeptor X (RXR), Amplified in Breast Cancer 3 (AIB3) und Leptin in normalen Plazenten des ersten Trimesters im Vergleich zu gestörten Schwangerschaften, insbesondere von Fehlgeburten und Blasenmolen. Daher war das Ziel der aktuellen Untersuchung das Expressionsmuster von PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta/\delta$ , RXR, AIB3 und Leptin im ersten Trimester bei normalen Schwangerschaften, Fehlgeburten und Blasenmolen zu ermitteln. Zusätzlich wurde analysiert, inwieweit PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta/\delta$ , RXR, AIB3 und Leptin als Marker von frühen Fehlgeburten eingesetzt werden können.



### 1.2 Definition des Aborts

Beim Abort handelt es sich um eine vorzeitige Beendigung der Gravidität mit oder ohne Ausstoßung der toten Frucht mit einem Geburtsgewicht unter 500g (18). Der Abort wird bis zur 12. Schwangerschaftswoche (SSW) in einen Frühabort und ab der 13.-24. SSW in einen Spätabort unterteilt. Ab der 24. SSW spricht man von einer Tot- bzw. Frühgeburt. Frühaborte kommen häufiger vor als Spätaborte (18). Die verschiedenen Formen des Aborts sind der Abortus imminens, incipiens, incompletus, completus, der verhaltene Abort (missed abortion), Abortus febrilis und der Abortus habitualis. Beim Abortus imminens (drohender Abort) kommt es zu vaginalen Blutungen, meist ohne Schmerzen, die Zervix ist geschlossen und die Gravidität intakt. Beim Abortus incipiens (in Gang befindlicher Abort) fängt die Zervix sich an zu öffnen und es kann zu stärkeren Blutungen kommen. Der Abortus incompletus beschreibt die Ausstoßung von Teilen der Schwangerschaft, mit zurückbleibenden Resten in der Gebärmutter. Der Abortus completus besteht aus einer vollständigen Ausstoßung von Fetus, Eihäuten und Plazenta. Die „missed abortion“ ist definiert als abgestorbene Fruchtanlage ohne Vitalitätszeichen, die im Uterus verblieben ist, ohne dass sie ausgestoßen wurde. Ein Abortus febrilis ist ein Spontanabort mit einer zusätzlichen aufsteigenden uterinen Infektion (18). Ein Abortus habitualis (habitueeller Abort, auch RSA = rezidivierende Spontanaborte) ist gemäß WHO definiert als mindestens 3-maliger konsekutiver Abort vor der 20. SSW und hat ein erhöhtes Rezidivrisiko (19).

### 1.3 Definition des Schwangerschaftsabbruchs

Von einem Spontanabort zu unterscheiden ist der Schwangerschaftsabbruch (Abruptio). Der Schwangerschaftsabbruch wird in Deutschland durch das 1995 geänderte Abtreibungsrecht und das Schwangeren- und Familienhilfeänderungsgesetz geregelt. Gemäß § 218a Strafgesetzbuch (StGB) ist jeder Schwangerschaftsabbruch strafbar, kann jedoch bei bestimmten Indikationen und einzuhaltenden Fristen durch einen Arzt rechtmäßig und straffrei vorgenommen werden (20).

### 1.4 Definition der Blasenmole

Die Blasenmole stellt eine hydropische Entartung der plazentaren Chorionzotten dar. Die Vaskularisation der veränderten Zotten ist reduziert oder fehlt. Der Trophoblast zeigt eine gesteigerte Proliferationsaktivität. Bei der vollständigen Blasenmole finden sich keine Anteile fetalen oder embryonalen Gewebes. Abzugrenzen ist die partielle Blasenmole, bei der sich neben blasig umgewandelten Zotten mit Trophoblastwucherungen aus chorialen und synzytialen Elementen auch normale Zotten finden und ein Embryo vorhanden ist. Die invasiven Formen wachsen über die Grenzen des Endometriums hinaus in die Tiefe. Die Häufigkeit von kompletten Blasenmolen beträgt 1:1500 (18). Partielle Blasenmolen kommen mit der Häufigkeit von etwa 1:700 Schwangerschaften vor (21), (22).

Bei der Blasenmole sind die Zotten in bis zu haselnussgroße, mit Flüssigkeit gefüllte Bläschen verwandelt. Es finden sich kaum Gefäßanlagen im Zottenstroma, so dass durch die mangelnde Gefäßversorgung der vorhandene Embryo fast immer abstirbt. Auf Grund der Wucherung bildet der entartete Trophoblast im Übermaß (bis zu 1 Million IE/l)  $\beta$ -humanes Choriongonadotropin ( $\beta$ -hCG), was man sich diagnostisch zu Nutze machen kann. Auch in der operativen Therapiekontrolle hat das  $\beta$ -hCG eine wichtige Rolle. Neben der klinischen Untersuchung, ist es wie ein Tumormarker von herausragender Bedeutung. Bei Verdacht auf Gewebereste einer Blasenmole im Uterus und hohen  $\beta$ -hCG Spiegeln besteht ein erhöhtes Risiko, eine invasive Blasenmole oder ein Chorionkarzinom zu entwickeln (18). Dieses Risiko ist bei komplikationslos verlaufenden Schwangerschaft niedrig, steigt aber bei kompletten Blasenmolen sehr stark an (23). Die Fruchtbarkeit von Patientinnen ist nach gestörten Schwangerschaften mit Blasenmole nicht beeinträchtigt (24). Frauen über 40 Jahre haben das größte Risiko für die Entwicklung einer kompletten Blasenmole (25). Aber auch Frauen, die jünger als 20 Jahre sind, haben ein erhöhtes Risiko (18). Die Entstehung einer partiellen Blasenmole ist dagegen nicht vom Alter der Mutter abhängig. Ein weiterer Risikofaktor für die Bildung einer partiellen als auch kompletten Blasenmole sind Spontanaborte in der Anamnese (25). Auch ernährungsbedingte Faktoren erhöhen das Risiko für die Entwicklung einer Blasenmole. Bei niedrigen Anteilen an tierischen Fetten und Karotin, einer Vorstufe von Vitamin A, steigt das Risiko proportional an (22).

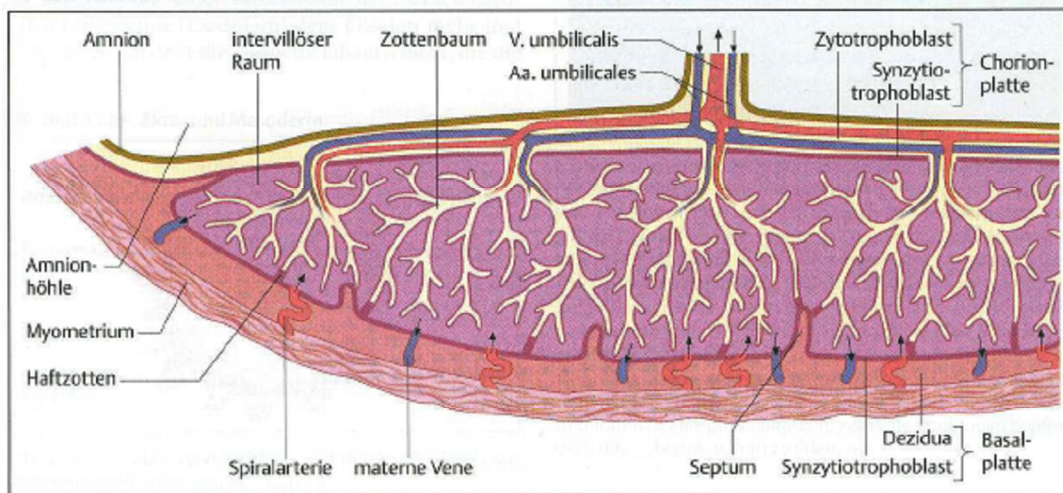
Rezidivierende Blasenmolen sind sehr selten. Dennoch haben Patientinnen mit einer Blasenmole in der Vorgeschichte ein um 1% erhöhtes Risiko erneut zu erkranken (18), (24).

### **1.5 Aufbau und Funktion der Plazenta**

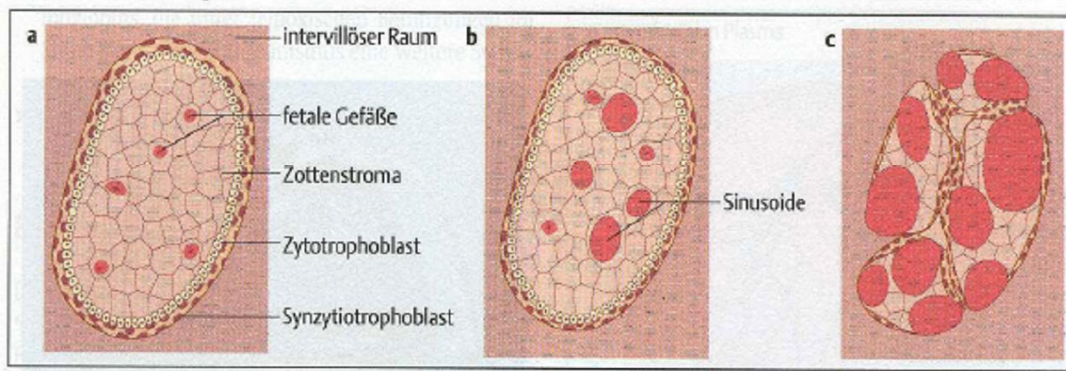
Die Plazenta dient zur Versorgung des Fetus mit Nährstoffen, Entsorgung von Exkretionsprodukten und stellt den Gasaustausch sicher. Sie erfüllt ebenso hormonelle Aufgaben und synthetisiert zahlreiche Proteohormone, Peptidhormone und Steroidhormone, die direkt in den maternalen und in den fetalen Kreislauf abgegeben werden. Die Plazentaufgaben werden im Laufe der Schwangerschaft an die Bedürfnisse des Fetus angepasst, besonders in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft, in welcher der Fötus sehr schnell wächst. Es wird daher von einer fetoplazentaren Einheit gesprochen (26).

Durch zunehmende Lakunenbildung ab dem 9. Tag post conceptionem (p.c.) wird der Synzytiotrophoblast (ST) schwammartig aufgelockert. Ab dem 13.Tag p.c. entstehen durch Proliferation des Zytotrophoblasten die Primärzotten (Chorionzotten). Aus den Trophoblastzellen bilden sich Trabekel, die sich zu einem Zottenbaum ausbreiten. Durch einwachsendes Mesenchym wandeln sie sich zu Sekundärzotten um (18), (27). Am 21. Tag p.c. bilden sich innerhalb des Mesenchymkerns Kapillaren durch de-novo Angiogenese und es entstehen die so genannten Tertiärzotten. Nach ein paar Tagen beginnt in den Zotten die embryonale Blutzirkulation (18), (28).

## Einleitung



**Abbildung (Abb.) 1: Aufbau einer reifen Plazenta (29)**



**Abb. 2: Zottenreifung ( 29)**

- unreife Zotte mit doppelreihiger Zottenwandung und wenigen kleinen, nicht wandständigen Gefäßen
- mit zunehmender Reifung wird die Zottenwandung dünner und die Vaskularisierung nimmt zu
- Reduktion des Zottendurchmessers. Der Zottenüberzug ist nur noch membranartig und zellarm. Die feto-maternale Diffusionsstrecke verringert sich. Die Kapillaren sind zu weitulmigen, wandständigen Sinusoiden umgewandelt.

### 1.6 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR)

Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) gehören ebenso zu den nukleären Hormonrezeptoren wie Retinoide, Rezeptoren für Steroidhormone, Schilddrüsenhormone und Vitamin D3 (30). PPARs binden Peroxisomenproliferatoren und kontrollieren dadurch die Größe und Anzahl an Peroxisomen in den Zellen. Sie sind Mediatoren der Verbindung zwischen dem Glukose- und Lipidstoffwechsel. Im Falle einer langen Glukosedepprivation stellen sie Fettsäuren und Ketonkörper aus dem Fettgewebe als Energiequelle zur Verfügung (31). Die Aktivierung der peroxisomalen Proliferation führt zu einer gesteigerten Transkription an Genen, welche in die peroxisomale und mikrosomale Fettsäureoxidation involviert sind.

Es gibt 3 verschiedene Unterformen von PPARs: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , auch PPAR $\delta$  genannt, sowie PPAR $\gamma$ . Jede Unterform besitzt ein spezifisches Expressionsmuster und wird durch ein eigenes Gen kodiert. Bei der Aktivierung von PPARs durch Liganden werden Heterodimere im Zellkern mit dem nukleären Hormonrezeptor RXR gebildet. Diese regulieren die Transkription diverser Gene durch eine Bindung an so genannte Peroxisomen Proliferator Response Elemente (PPREs) in der Promotorregion der Zielgene. Beide Rezeptoren (PPAR und RXR) können durch selektive Liganden des jeweils anderen Rezeptors additiv oder synergistisch aktiviert werden (32).

#### 1.6.1 PPAR $\alpha$

PPAR $\alpha$  konnte beim Menschen bisher in Leber, Niere, Herz, Endothel, Skelettmuskel, Retina, Darm, Lunge, Pankreas und Fettgewebe nachgewiesen werden (33). PPAR $\alpha$  moduliert die Transkription von Genen, welche für den Lipidstoffwechsel und die Bereitstellung von Apoproteinen (Kontrolle des Cholesterinspiegels) verantwortlich sind (34).

### 1.6.2 PPAR $\beta/\delta$

PPAR $\beta/\delta$  kommt ubiquitär in vielen Organen vor, im Intestinum und der Plazenta allerdings vermehrt. PPAR $\beta/\delta$  hat Einfluss auf das Entzündungsgeschehen, die Keratinozyten-differenzierung, Wundheilungsprozesse und den Lipidstoffwechsel.

PPAR $\beta/\delta$  spielt eine essentielle Rolle bei der Plazentation. Embryonen von PPAR $\beta/\delta$  knock-out Mäusen sterben aufgrund einer Störung im Bereich der feto-maternalen Interphase (35), (36), (37). Die PPAR $\beta/\delta$  Expression wird zwischen dem ersten und dritten Trimenon hochreguliert. Es konnte eine erhöhte Expression von PPAR $\beta/\delta$  an Implantationsstellen und dezidualen Zellen im Uterus von Ratten nachgewiesen werden (35), (36), (37), (38), (39), (40).

### 1.6.3 PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  findet sich in niedrigen Konzentrationen in Knochenmark, Milz, Hoden, Gehirn, Skelettmuskel, Leber und Darm. Hohe Konzentrationen lassen sich in Fettgewebe, fetalen Endothelzellen und der Plazenta nachweisen (33). PPAR $\gamma$  fungiert als Regulator der Adipozytendifferenzierung und der Insulinsensitivität und hat Einfluss auf die Hämostase des Fett- und Glukosestoffwechsels (41). Auch in einigen malignen Tumoren wie Liposarkomzellen und Brustkrebszellen findet sich eine stark erhöhte PPAR $\gamma$  Expression (41). Im Laufe der Monozytendifferenzierungen zu Makrophagen steigt die Expression von PPAR $\gamma$  stetig an. Dies deutet auf einen möglichen Einfluss von PPAR $\gamma$  auf das Entzündungsgeschehen hin (42).

### 1.7 Amplified Brustkrebs-3 Gen (AIB3)

AIB3 ist ein starker transkriptionaler Koaktivator für nukleäre Hormonrezeptoren wie RXR, PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$ . Das kodierte Protein ist beteiligt bei der hormonabhängigen Co-aktivierung von zahlreichen Rezeptoren, wie zum Beispiel Prostanoiden, Retinoiden und Steroid-Rezeptoren.

AIB3 wird für die Entfaltung der PPAR $\gamma$  Funktion bei der Plazentaentwicklung benötigt, sowie für die normale embryonale Herzentwicklung. AIB3 knock-out Mäuse zeigen eine intrauterine Wachstumsretardierung und sterben am 9.-11. Tag post conceptionem (35), (36), (37), (38).

### 1.8 Retinoid X Rezeptor (RXR)

PPARs bilden bei der Bindung an ihre PPRE-Erkennungssequenzen Heterodimere mit RXR und diese Heterodimere regulieren die Transkription diverser Gene. RXR kontrolliert den biologischen Effekt der Retinoide durch seinen Einfluss auf die Retinoid-Säure vermittelte Genaktivierung. Beide Rezeptoren (PPAR und RXR) können durch selektive Liganden des jeweils anderen Rezeptors additiv oder synergistisch aktiviert werden (32). RXR ist ebenso wie PPAR $\gamma$  essentiell für die Plazentaentwicklung und Aufrechterhaltung des feto-maternalen Austausches. RXR knock-out Mäuse zeigen eine gestörte Plazentaentwicklung mit frühem embryonalen Tod (37), (38), (39), (40).

### 1.9 Leptin

Leptin ist ein Proteohormon das größtenteils von Adipozyten abgegeben wird. Es hemmt das Auftreten von Hungergefühlen und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Fettstoffwechsels von Menschen und Säugetieren (43). Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch natürliche Liganden oder Thiazolidinedione (TZD) inhibiert die Leptin- Expression und Freisetzung in vivo bei Nagetieren und in vitro in isolierten Fettzellen und Zellkulturen (44). Obwohl neueste Untersuchungen eine mögliche Interaktion zwischen PPARs und Leptin zeigten, bleiben die pathophysiologischen Mechanismen unbekannt.

## Einleitung

---

Des Weiteren gibt es widersprüchliche Studien über den Leptinspiegel im Serum bei Patientinnen mit Fehlgeburten. Während Laird et al. signifikant niedrigere Leptinkonzentrationen im Serum von Frauen mit Fehlgeburten aufzeigten, gab es in einer Studie von Tommaselle et al. keine Unterschiede zwischen den Leptinspiegeln von Frauen mit normalen und gestörten Schwangerschaften (45), (46). Jedoch könnten diese Unterschiede mit den verschiedenen Blutabnahmezeiten in Bezug auf den Zeitpunkt des Aborts (SSW) innerhalb der Studien zurückzuführen sein.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Untersuchungsmaterialien**

Paraffinschnitte von Patientinnen welche eine Abortkürettage aufgrund eines Spontanabortes (n=16), einer Blasenmolenschwangerschaft (n=16) oder eines Schwangerschaftsabbruches nach § 218 erhielten, wurden aus dem Archiv der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Universität München – Campus Maistrasse, bereitgestellt. Der Schwangerschaftsabbruch wurde durch eine komplette Abrasio der Plazenta und des Fötus durchgeführt, ohne Zuhilfenahme einer Saugkürettage oder einer hormonellen Nachbehandlung. Die induzierten Aborte oder Abruptiones wurden zur Kontrollgruppe zusammengefasst, während die Abortgruppe und die Gruppe der Blasenmolen die Fallgruppen darstellten. Das Gewebe stammte jeweils aus den SSW 6-17. Ebenso wurden die demographischen und klinischen Daten der Studienpatientinnen in Tabelle 1 erfasst.

Daten	Normale Schwangerschaft n=16	Abort n=16	Blasenmole n=16	p Wert (Kruskal-Willis-Test)
Mütterliches Alter	28.1 ± 7.4 (16-43)	30.9 ± 6.6 (22-41)	31.1 ± 5.2 (23-40)	0.35
Schwangerschaftswoche	9.8 ± 3.0 (6-17)	9.6 ± 2.7 (6-16)	9.6 ± 2.4 (6-16)	1.0
Gravidität	2.4 ± 1.5 (1-6)	2.8 ± 1.6 (1-7)	1.9 ± 1.1 (1-4)	0.26
Parität	0.8 ± 1.0 (0-3)	0.6 ± 1.3 (0-5)	0.4 ± 0.5 (0-1)	0.42

**Tabelle 1.** Demographische und klinische Daten der Studienpatientinnen.  
Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD);  
(Minimum – Maximum) (p Werte nicht signifikant)

## Material und Methoden

---

Insgesamt wurden 48 Schnitte pro Antikörper gefärbt (240 Schnitte plus die jeweiligen Positivkontrollen). Die genaue Menge der Schnitte je SSW ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Schwangerschaftswoche	Anzahl der Schnitte		
	Kontrolle	Abort	Blasenmole
6. SSW	2	1	1
7. SSW	1	3	2
8. SSW	3	2	3
9. SSW	3	3	3
10. SSW	2	2	2
11. SSW	2	2	2
12. SSW	1	1	1
13. SSW			1
14. SSW		1	
15. SSW	1		1
16. SSW		1	
17. SSW	1		
Gesamtanzahl	n= 16	n=16	n=16

**Tabelle 2.** Anzahl der histologischen Schnitte je SSW

Als Positivkontrolle für alle Antikörper diente plazentares Gewebe des zweiten und dritten Trimesters und Gewebe von Patientinnen mit Mammakarzinom. Diese Studie wurde von der Ethikkommission des Klinikums Großhadern (Prof. Dr. G. Paumgartner) bewilligt. Die Projektnummer lautet: 337-06.

### **2.1.1 Aufbereitung der Paraffinschnitte**

Von den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms jeweils 2-3 µm dicke Gewebeschnitte gewonnen und nach Glättung im Streckbad in 45°C warmen destillierten Wasser (H<sub>2</sub>O dest.) auf speziell für die Immunhistochemie beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Fa. Langenbrinck, Walldorf, Deutschland) aufgezogen. Um eine besser Haftung zu gewährleisten wurden die Schnitte zusätzlich zur Beschichtung über Nacht bei 56-58°C im Brutschrank getrocknet. Bis zur eigentlichen immunhistochemischen Versuchsreihe wurden die Schnitte nummeriert und in Objektträgermappen aufbewahrt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Immunhistochemie**

Zum ortsrichtigen Nachweis der Kernrezeptoren und des Proteohormons Leptin wurden monoklonale und polyklonale Antikörper (AK) der Firmen Biozol, Perseus und Novus gegen PPARβ/δ, PPARγ, AIB3, RXR und Leptin mit der Avidin-Biotincomplex-Peroxidase-(ABC)-Methode angewendet (siehe Tabelle 3).

Die Detektion basiert bei dieser Methode auf den Wechselwirkungen zwischen dem niedermolekularen Vitamin Biotin und dem Glykoprotein Avidin (MG 68 kDa). Da es teilweise zu unspezifischen Reaktionen bei der Verwendung von Avidin kommt, wurde auf gentechnischem Weg ein reineres Produkt, das Streptavidin, verwendet.

Über einen gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper (in diesem Fall Horse-Anti-Rabbit und Horse-Anti-Mouse) wird der Primärantikörper (Tabelle 3) mit dem vorgeformten Avidin-Biotin-Enzymkomplex (AB-Complex) verbunden.

## Material und Methoden

Antikörper	Klon	Isotyp	Verdünnung	Quelle
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	BC004174	Rabbit IgG	1:2000	Biozol, Eching, Deutschland
<b>PPAR<math>\beta/\delta</math></b>	GC06P035418	Rabbit IgG	1:1600	Biozol, Eching, Deutschland
<b>RXR</b>	K8508	Mouse IgG	1:4000	Perseus Proteomics, Inc, Tokyo Japan
<b>AIB3</b>	NB 100-1728	Rabbit IgG	1:700	Novus Biologicals, Inc, Littleton, USA
<b>Leptin</b>	GC07P127668	Rabbit IgG	1:500	Biozol, Eching, Germany
<b>CK7</b>	OV-TL12/30	Mouse IgG1	1:30	Novocastra, Dossenheim, Germany

**Tabelle 3.** Primärantikörper für die Durchführung der Immunhistochemie

Das Avidin-Molekül hat eine sehr hohe Affinität für Biotin, es hat bis zu vier Bindungsstellen für selbiges und die Bindung ist irreversibel. Es kann somit mehrere Peroxidasemoleküle über eine baumartig verzweigte Antikörperstruktur auf einem einzigen Primärantikörper aufbauen. Es kommt zu einer Farbreaktion, indem die Peroxidase mit dem Substratpuffer Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und dem jeweiligen Chromogen (in diesem Fall 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)) ein farbiges Endprodukt bildet. Das Chromogen AEC bildet ein rotbraunes Farbprodukt und ist in organischen Lösungsmitteln löslich.

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit saurem Hämalaun nach Mayer. Dabei handelt es sich um einen basischen Farbstofflack in saurer Lösung mit einem pH-Wert von 4,5. In diesem Milieu werden nur die Kerne angefärbt, da diese negative Ladungen besitzen. Dabei lagern sich die positiv geladenen basischen Farbstoffe an die negativ geladene Phosphatgruppe der DNS im Kern an. Das Auswaschen der Säurereste und das Färben erfolgten in Leitungswasser (alkalisches Milieu). Das Eindecken erfolgte mit Aquatex auf wässriger Basis, da AEC in organischen Lösungsmitteln löslich ist. Es hat den gleichen Brechungsindex wie Glas und verschließt die Präparate luftdicht.

### 2.2.2 Lösungsansätze

- 3%iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  für Paraffinschnitte: 150 ml Methanol + 4,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$
- Natrium-Citratpuffer: 18 ml Lösung A + 82 ml Lösung B + 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest.  
Lösung A: 21,01g 0,1M Zitronensäure + 1l  $\text{H}_2\text{O}$  dest.  
Lösung B: 29,41g 0,1M Na-Citrat + 1l  $\text{H}_2\text{O}$  dest.
- Human Serum AK-Block: Human Serum AK 1:10 verdünnt in sterile Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
- Vectastain Elite IgG-Kits:
  - Blockierungsserum: 3 Tropfen Normalserum + 10 ml steriles PBS
  - Sekundärantikörper: 3 Tropfen Normalserum + 1 Tropfen Anti-mouse-IgG (bzw. Anti-rabbit,) + 10 ml Dako-Verdünnungsmedium
  - ABC-Komplex: 4 Tropfen Reagenz A + 4 Tropfen Reagenz B + 10 ml steriles PBS (30 min vor Gebrauch ruhen)
- 3,3 Diaminobenzidin (DAB): 3 Tropfen DAB Chromogen + 3 ml Pufferkonzentrat

### 2.2.3 Immunhistochemie Färbeschema

- 1.) Entparaffinieren für 15 min im Xylol
- 2.) 2 x 100% Alkohol
- 3.) Blockierung der endogenen Peroxidase durch:  
20 min. in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für Paraffinschnitte
- 4.) 2 x 96% + 2 x 70% Alkohol
- 5.) in H<sub>2</sub>O dest. spülen
- 6.) Demaskierung durch Hitzevorbehandlung im Schnellkochtopf mit Na-Citratpuffer  
pH 6,0 für 5 min
- 7.) in H<sub>2</sub>O dest. spülen
- 8.) 2x2 min. in PBS waschen, pH 7,4

9.) Für PPAR $\gamma$ : Inkubation mit 60 min Human Serum AK- Block

Für PPAR $\beta/\delta$ : Inkubation mit 60 min Human Serum AK- Block

Für RXR: Inkubation mit 20 min Blockierungsserum aus Vectastain  
Elite IgG-Kit

Für AIB3: Inkubation mit 20 min Blockierungsserum aus Vectastain  
Elite IgG-Kit

Für Leptin: Inkubation mit 20 min Blockierungsserum aus Vectastain  
Elite IgG-Kit

- 10.) Abschütten des Blocks ohne spülen
- 11.) Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht (16 h bei 4 °C)
- 12.) 2x2 min in PBS waschen
- 13.) Inkubation mit verdünntem biotinilierten Zweitantikörper für 30 min bei  
Raumtemperatur (RT)
- 14.) 2x2 min in PBS waschen
- 15.) Inkubation für 30 Min mit ABC-Komplex
- 16.) 2x2 min in PBS waschen
- 17.) Substratfärbung mit DAB für 5 min in Dunkelkammer
- 18.) 2x2 min in H<sub>2</sub>O dest. Waschen
- 19.) Gegenfärbung mit saurem Hämalaun nach Mayer für 2 min
- 20.) In Leitungswasser bläuen für 5 min
- 21.) Aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
- 22.) Eindecken mit „Eukitt“

### 2.2.4 Auswertung

Die Intensität und das Verteilungsmuster der Antigen-Expression wurden von 2 unabhängigen Beobachtern mit Hilfe eines semiquantitativen Scores ermittelt (IRS) (47). Keiner von beiden hatte Zugang zu den Diagnosen der Patientinnen. Dieser semiquantitative Score berücksichtigt die beiden Parameter Färbeintensität (staining intensity = SI) und Prozentsatz der immunhistochemisch positiv angefärbten Zellkerne im Gewebe (PP) und setzt sie beide miteinander ins Verhältnis. Errechnet wurde der Score durch Multiplikation beider Parameter. Er kann Werte von 0 bis 12 annehmen (47).

#### Färbeintensität (SI) der betrachteten Zellkerne:

- 0 = keine Farbreaktion
- 1 = schwache Färbeintensität
- 2 = mittlere Färbeintensität
- 3 = starke Färbeintensität

#### Prozentsatz positiv angefärbter Zellkerne:

- 0 = keine positiven Zellkerne
- 1 =  $\leq 10\%$  positive Zellkerne
- 2 = 11-50 % positive Zellkerne
- 3 = 51-80 % positive Zellkerne
- 4 =  $\geq 81\%$  positive Zellkerne

#### Es ergaben sich folgende Expressionsgrade:

- 0 = keine Expression
- 1-3 = schwache Expression
- 4-8 = mäßige Expression
- 9-12 = starke Expression

Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Leitz Fotomikroskopes (Wetzlar, Deutschland) untersucht. Die digitalen Bilder wurden mit einem digitalen Kamera-System (JVC, Japan) aufgenommen und auf Festplatte gespeichert. Das Computerprogramm SPSS für Windows® (Social Sciences computer software version 15.0; SPSS Inc., Chicago, USA) wurde für die Erfassung, Bearbeitung und die statistischen Analysen genutzt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests ( $p < 0,05$  signifikant) zum Vergleich der Mittelwerte, sowie des Wilcoxon-Test zum Vergleich von gepaarten Proben in der Matched-Pair Analyse.

Zusätzlich wurde der nicht-parametrische Spearman Korrelations Koeffizient genutzt, um die Korrelation zwischen PPARs, AIB3 und RXR kalkulieren zu können

### 2.2.5 Immunfloreszenz-Doppelfärbung

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung ist eine Methode, um eine Simultanexpression zweier Proteine in der gleichen Zelle nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der PPAR-Untereinheiten  $\beta/\delta$ , PPAR $\gamma$  und Leptin an Gefrierschnittpräparaten von Ersttrimesterplazenten nachgewiesen.

#### Schema:

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Objektträger wurden in Alufolie zugedeckt 10 min lang bei RT aufgetaut und dann etwa 20 min getrocknet. Nach der Fixierung mit Aceton für 5 min wurden die Präparate erstmals mit PBS für 6 min gespült. Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen (*siehe Kapitel Immunhistochemie*) erfolgte mit Ultra V Block für 15 min. Nach diesem Schritt wurden die Präparate nicht mit PBS gespült, um die unspezifischen Bindungsstellen nicht wieder freizulegen. Die Antikörper gegen die jeweils nachzuweisenden Kernrezeptoren beziehungsweise Leptin wurden mit Dako verdünnt, diese Lösung wurde auf die Präparate aufgetragen und über Nacht (ca. 16 h) im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Vor dem nächsten Schritt wurden die Objektträger erneut 3x für 2 min mit PBS gespült. Ab diesem Zeitpunkt musste möglichst ohne Lichteinwirkung gearbeitet werden,



## Material und Methoden

---

da die Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Antikörper markiert sind, im Sonnenlicht schnell zerfallen. Der mit dem Farbstoff Cy 2 (grün) markierte Sekundärantikörper Goat-Anti-Mouse IgG-Antikörper wurde genauso wie der mit dem Farbstoff Cy3 (rot) markierte Goat-Anti-Rabbit IgG-Antikörper 1:200 verdünnt und auf die Präparate mit dem Primärantikörpern aufgetragen (Tabelle 4). Die Antikörper inkubierten anschließend 30 min bei RT. Der Sekundärantikörper wurde dann in einer letzten PBS-Spülung (3 x 2min) abgewaschen und die Präparate trockneten im Dunkeln. Das Eindecken erfolgte mit einem Mounting Medium der Fa. Vector, welches 4,6 Diamino-2-Phenylindol (DAPI) enthält.

Antikörper	Klon	Isotyp	Verdünnung	Quelle
CY2	111-225-144	Goat Anti-Mouse IgG	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland
CY3	115-167-003	Goat Anti-Rabbit IgG	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland

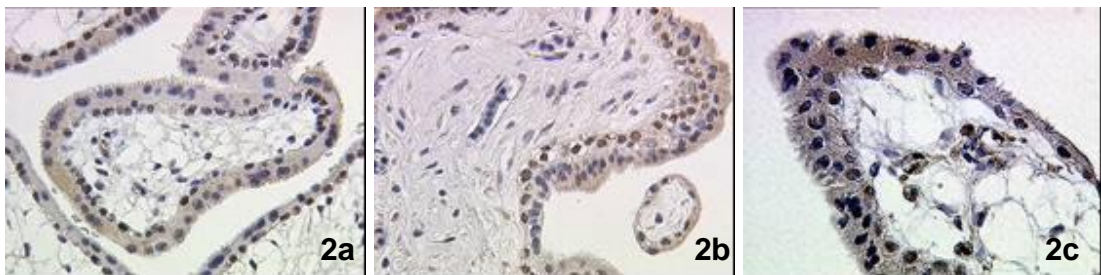
**Tabelle 4.** Sekundärantikörper für die Durchführung der Immunfluoreszenz Doppelfärbung

Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Zeiss Axiophot Fotomikroskopes (Jena, Deutschland) untersucht. Die digitalen Bilder wurden mit einem digitalen Kamera-System (Axiocam, Zeiss, Jena, Germany) aufgenommen und auf Festplatte gespeichert.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 PPARs**

PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  wurden in den Zellkernen der ST in Abortgewebe, Blasenmole sowie normalen Plazenten im ersten Trimester exprimiert (Abbildungen 2a-c, 3a-c).



**Abb. 2a-c:** Immunhistochemische Expression von PPAR $\gamma$  in Zellen der villösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (2a), der Abortgruppe (2b) und bei der Blasenmole (2c), 25x Objektiv.



**Abb. 3a-c:** Immunhistochemische Expression von PPAR $\beta/\delta$  in Zellen der villösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (3a), der Abortgruppe (3b) und bei der Blasenmole (3c), 25x Objektiv.

## Ergebnisse

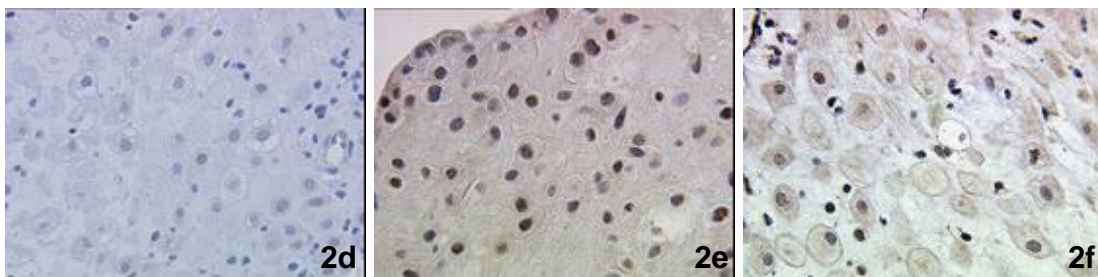
---

Es konnte eine gleich bleibende Expression von PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  bei Aborten und normalen Schwangerschaften im Zeitraum 6. bis 12. SSW nachgewiesen werden.

In ST von Abortplazenten war die Expression von PPAR $\gamma$  erhöht, ohne jedoch eine statistische Signifikanz zu erreichen. Dies war begleitet von einer signifikanten Erhöhung der PPAR $\beta/\delta$  Expression ( $p=0.03$ ).

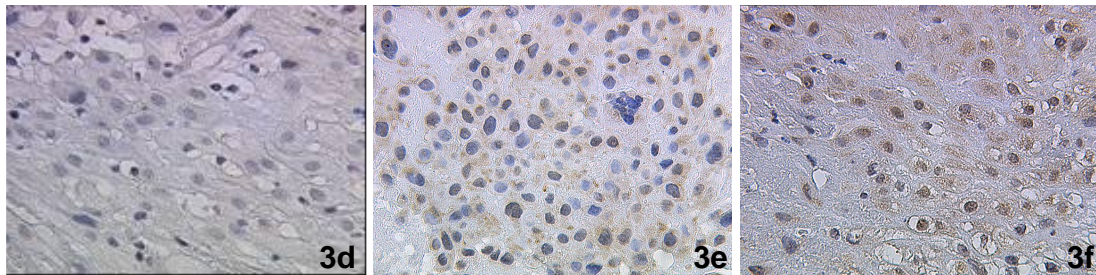
In den Extravillösen Synzytiotrophoblasten (EVT) von Abort Patientinnen in der 6. bis 12. SSW war die Expression von PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  signifikant erhöht im Vergleich zu normalen Schwangerschaften ( $p=0.006$  und  $p=0.001$ ).

Im Hinblick auf Blasenmolenschwangerschaften wurde sowohl PPAR $\gamma$  als auch PPAR $\beta/\delta$  signifikant erhöht in den ST ( $p=0.006 < 0.001$ ) exprimiert. PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  wurden ebenfalls in den Zellkernen von EVT (Abbildungen 1d-f, 2d-f) nachgewiesen. Eine komplette Darstellung der Ergebnisse ist den Abbildungen 2g und 3g zu entnehmen.

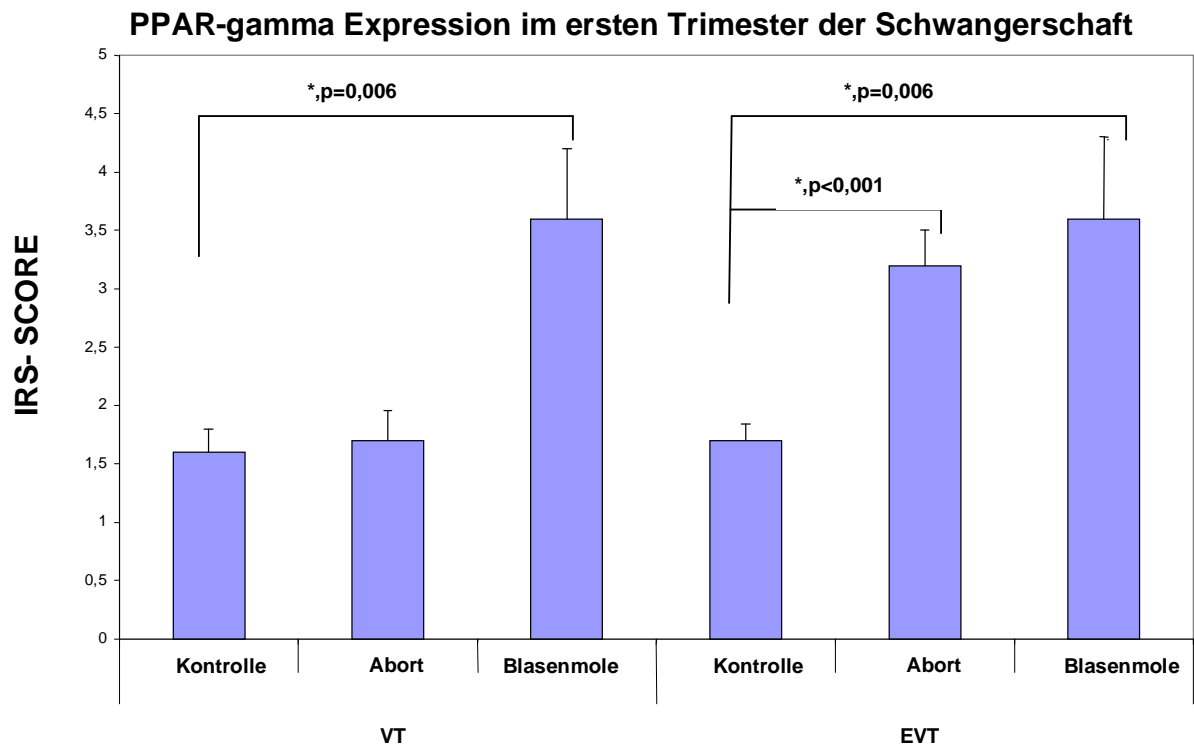


**Abb. 2d-f:** Immunhistochemische Expression von PPAR $\gamma$  in Zellen der extravillösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (2d), der Abortgruppe (2e) und bei der Blasenmole (2f), 25x Objektiv.

## Ergebnisse

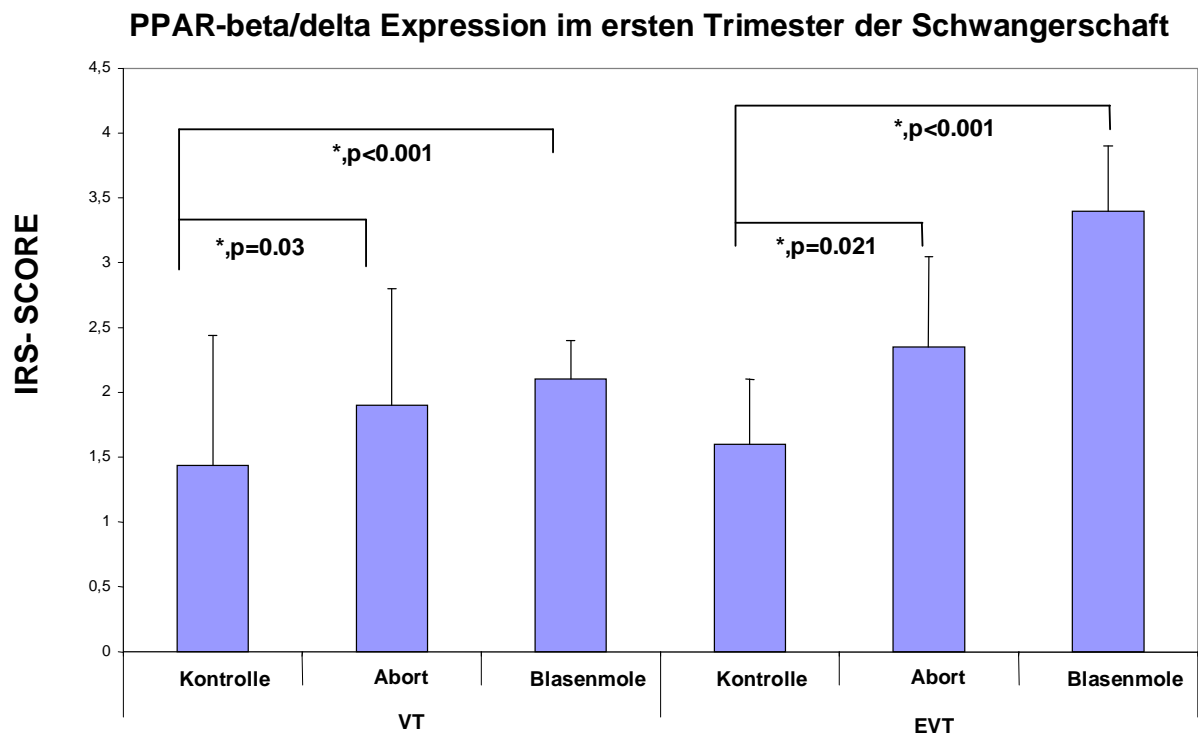


**Abb. 3d-f:** Immunhistochemische Expression von PPAR $\beta/\delta$  in Zellen der extravillösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (3d), der Abortgruppe (3e) und bei der Blasenmole (3f), 25x Objektiv.



**Abb. 2g:** Zusammenfassung der Färbeergebnisse (IRS scores) der immunhistochemischen Lokalisation von PPAR $\gamma$  in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und Blasenmolenschwangerschaften im ersten Trimester in VT und EVT. (Mittelwerte + SD) ( $p < 0.05$  signifikant)

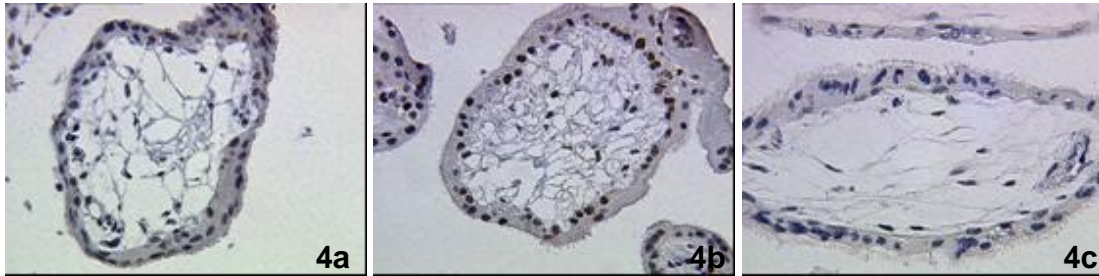
## Ergebnisse



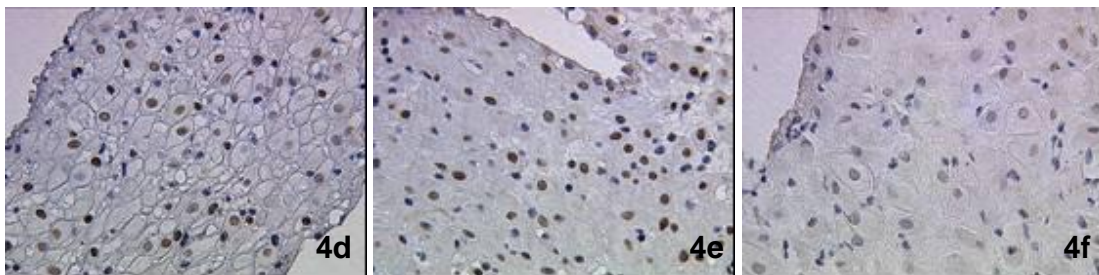
**Abb. 3g:** Zusammenfassung der Färbeergebnisse (IRS scores) der immunhistochemischen Lokalisation von PPAR $\beta/\delta$  in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und Blasenmolenschwangerschaften im ersten Trimester in VT und EVT. (Mittelwerte + SD) (p< 0.05 signifikant)

### 3.2 RXR und AIB3

Die Expression von RXR und AIB3 wurde in den Zellkernen der ST und EVT bei Aborten, Blasenmolen und normalen Schwangerschaften nachgewiesen (Abbildungen 4a-g; 5a-g).



**Abb. 4a-c:** Immunhistochemische Expression von RXR in Zellen der villösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (4a), der Abortgruppe (4b) und bei der Blasenmole (4c), 25x Objektiv.

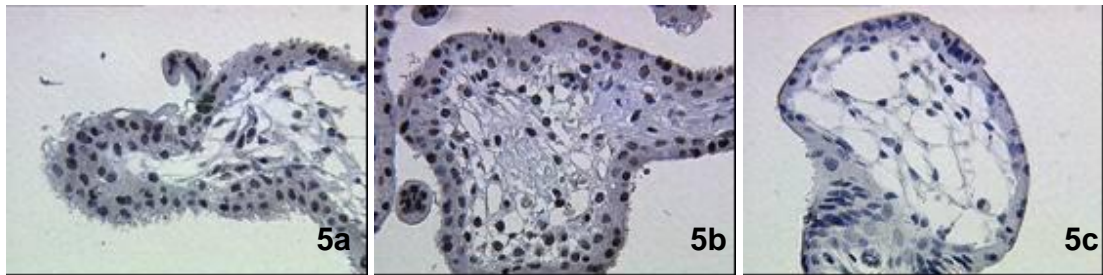


**Abb. 4d-f:** Immunhistochemische Expression von RXR in Zellen der extravillösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (4d), der Abortgruppe (4e) und bei der Blasenmole (4f), 25x Objektiv.

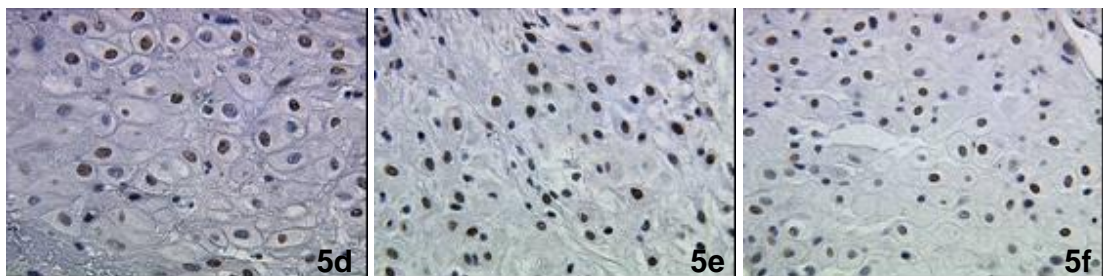


## Ergebnisse

---



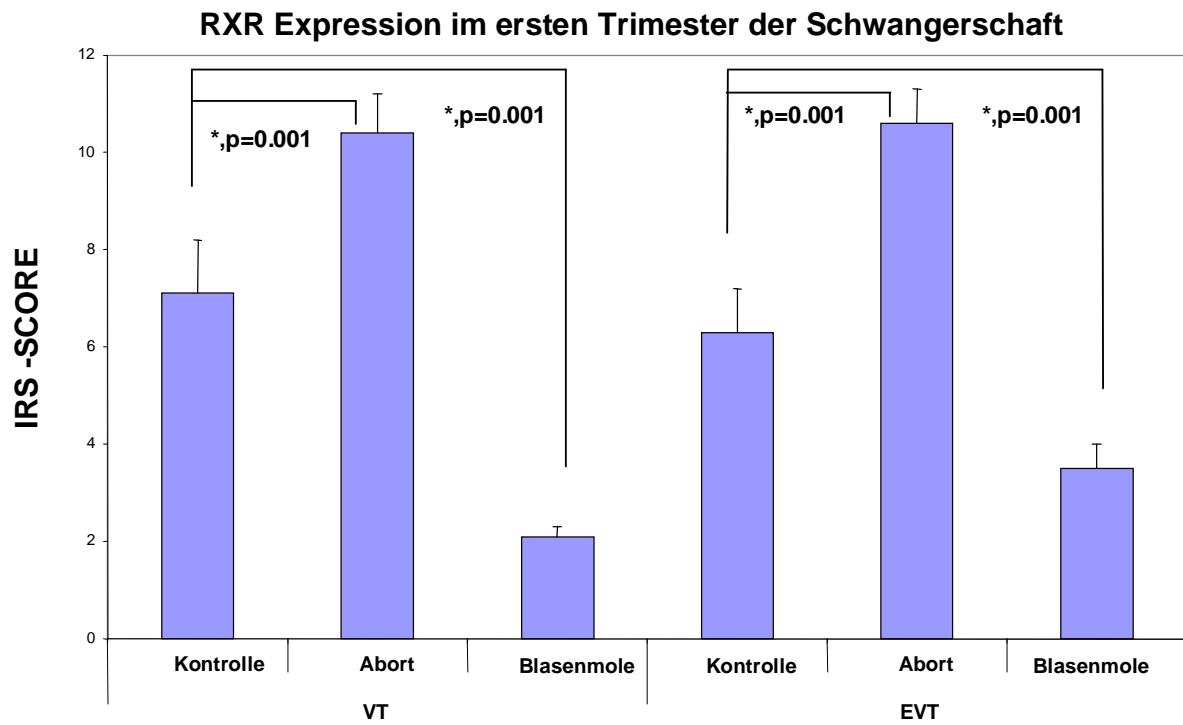
**Abb. 5a-c:** Immunhistochemische Expression von AIB3 in Zellen der villösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (5a), der Abortgruppe (5b) und bei der Blasenmole (5c), 25x Objektiv.



**Abb. 5d-f:** Immunhistochemische Expression von AIB3 in Zellen der extravillösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (5d), der Abortgruppe (5e) und bei der Blasenmole (5f), 25x Objektiv.

Bei Aborten zeigte sich eine positive Korrelation der Expression zwischen RXR und  $\text{PPAR}\beta/\delta$  ( $p=0.043$ ;  $\rho=0.512$ ), wohingegen sich bei unauffälligen Schwangerschaften des ersten Trimesters eine positive Korrelation in der Expression von RXR und AIB3 ( $p=0.034$ ;  $\rho=0.532$ ) zeigte. Im Hinblick auf Blasenmolenschwangerschaften korrelierte die AIB3 Expression signifikant mit einer vermehrten  $\text{PPAR}\gamma$  Expression ( $p=0.003$ ;  $\rho=0.695$ ). Signifikante Unterschiede zeigten sich im Vergleich der RXR Expression bei Aborten, Blasenmolen und normalen Schwangerschaften in EVT und ST (jeweils  $p=0.001$ ). AIB3 wurde in den ST und EVT im Abortgewebe verstärkt exprimiert im Vergleich zu unauffälligen Schwangerschaften. Eine Signifikanz ergab sich nur in den ST in der Matched-Pair Analyse ( $p=0.036$ ). Bei Blasenmolen war dagegen die AIB3 Expression in den ST erniedrigt und in den EVT erhöht im Vergleich zu normalen Schwangerschaften und Aborten, jedoch ohne eine Signifikanz zu erreichen. Eine komplette Darstellung der Ergebnisse ist den Abbildungen 4g und 5g zu entnehmen.

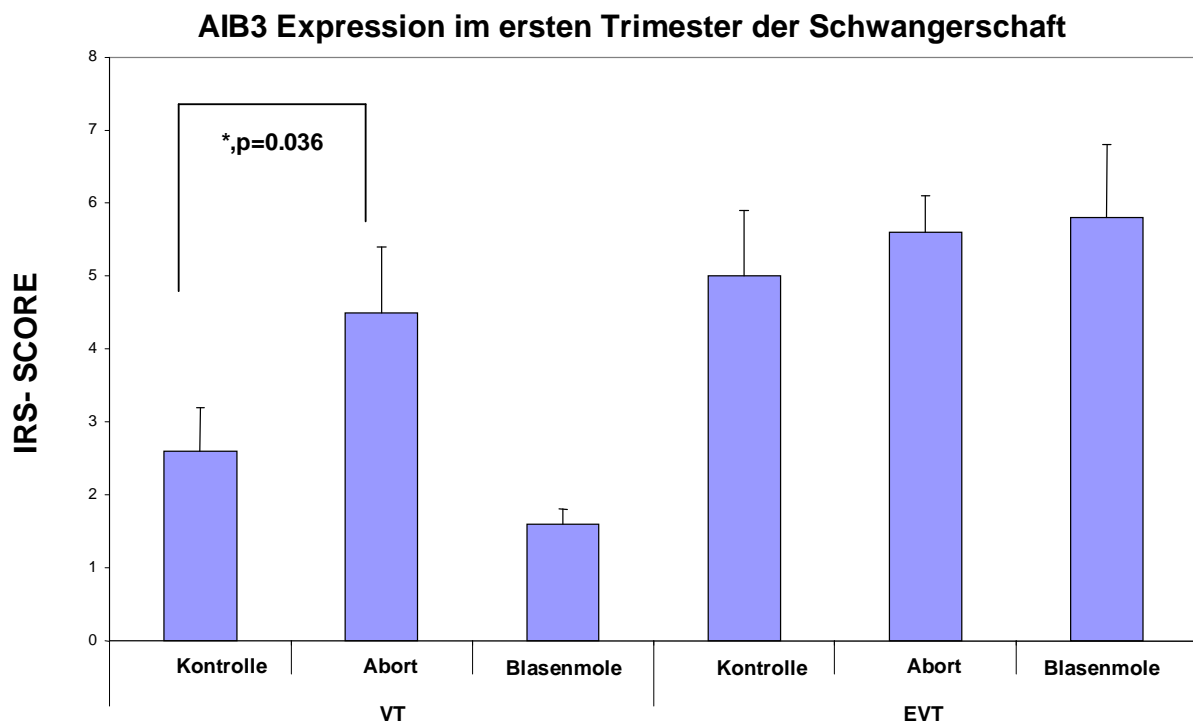
## Ergebnisse



**Abb. 4g:** Zusammenfassung der Färbeergebnisse (IRS scores) der immunhistochemischen Lokalisation von RXR in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und Blasenmolenschwangerschaften im ersten Trimester in VT und EVT. (Mittelwerte + SD) ( $p < 0.05$  signifikant)



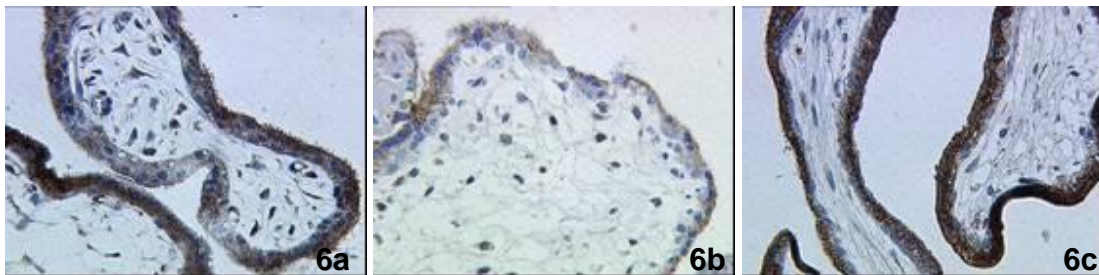
## Ergebnisse



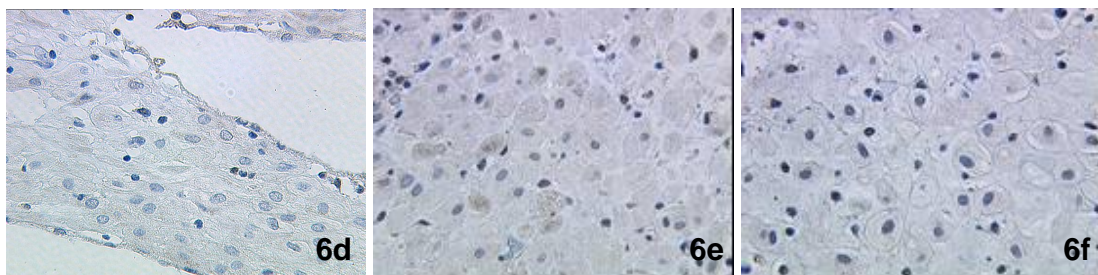
**Abb. 5g:** Zusammenfassung der Färbeergebnisse (IRS scores) der Immunhistochemischen Lokalisation von AIB3 in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und Blasenmolenschwangerschaften im ersten Trimester in VT und EVT. (Mittelwerte + SD) ( $p < 0.05$  signifikant)

### 3.3 Leptin

Die Expression von Leptin im Zytoplasma von ST und EVT wurde in normalen und gestörten Schwangerschaften während des ersten Trimesters (Abbildungen 6, a-f) nachgewiesen.



**Abb. 6a-c:** Immunhistochemische Expression von Leptin in Zellen der villösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (6a), der Abortgruppe (6b) und bei der Blasenmole (6c), 25x Objektiv.

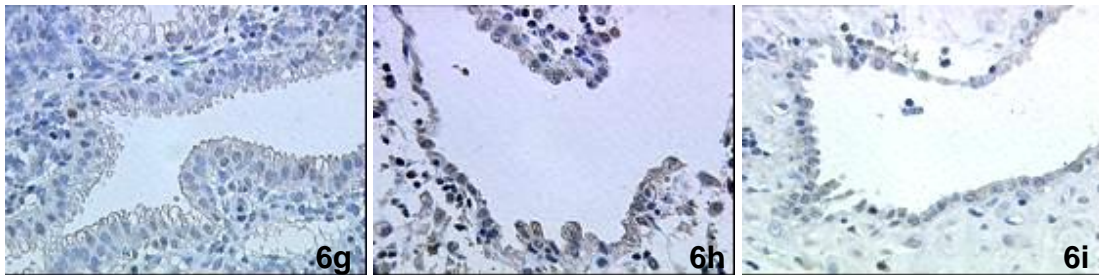


**Abb. 6d-f:** Immunhistochemische Expression von Leptin in Zellen der extravillösen Trophoblastzellkerne in der Kontrollgruppe (6d), der Abortgruppe (6e) und bei der Blasenmole (6f), 25x Objektiv.

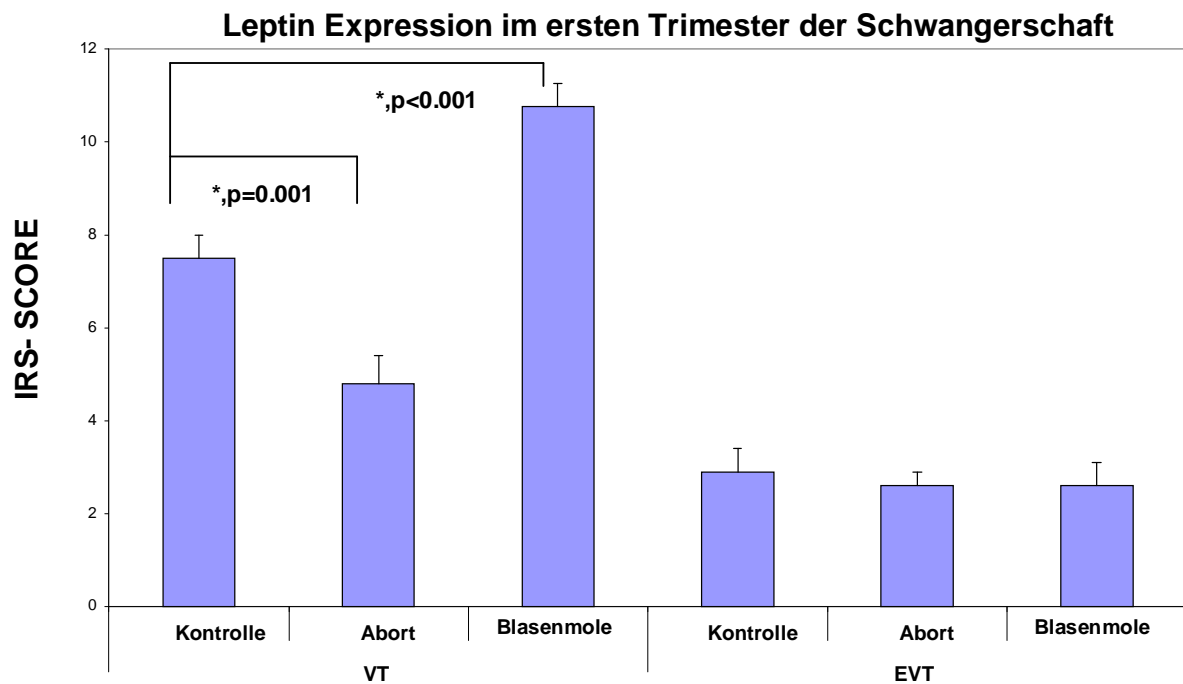
Die höchste Expression von Leptin zeigte sich in den ST von Blasenmolen ( $p < 0.001$ ) und die niedrigste Expression in den ST der Abortplazenten ( $p = 0.001$ ). In den EVT zeigten sich keine Unterschiede in der Leptin Expression zwischen normalen und pathologischen Schwangerschaften.

Zusätzlich wird Leptin ebenfalls in Drüsenepithelzellen der Dezidua exprimiert und war signifikant hochreguliert im Abortgewebe im Vergleich zu normalen Schwangerschaften ( $p = 0.003$ ) (Abbildungen 6j, 6k).

## Ergebnisse



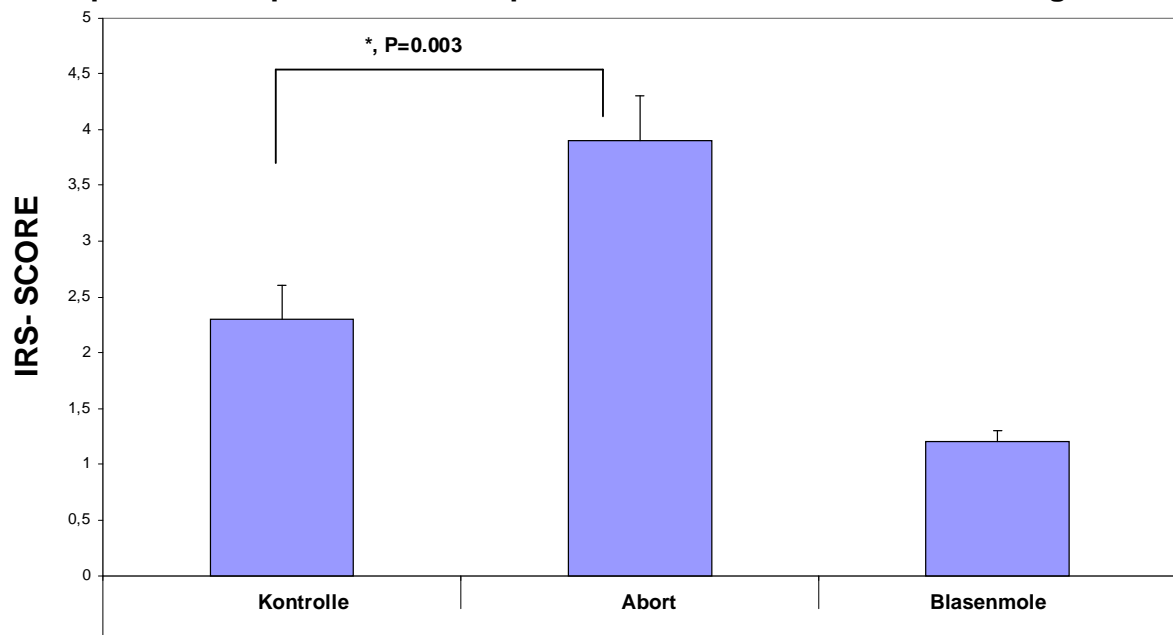
**Abb. 6g-i:** Immunhistochemische Expression von Leptin in Drüsenzellkerne in der Kontrollgruppe (6g), der Abortgruppe (6h) und bei der Blasenmole (6i), 25x Objektiv.



**Abb. 6j:** Zusammenfassung der Färbeergebnisse (IRS scores) der Immunhistochemischen Lokalisation von Leptin in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und Blasenmolenschwangerschaften im ersten Trimester in VT und EVT. (Mittelwerte + SD) ( $p < 0.05$  signifikant)

## Ergebnisse

### Drüsenepithelzell Expression von Leptin im ersten Trimester der Schwangerschaft

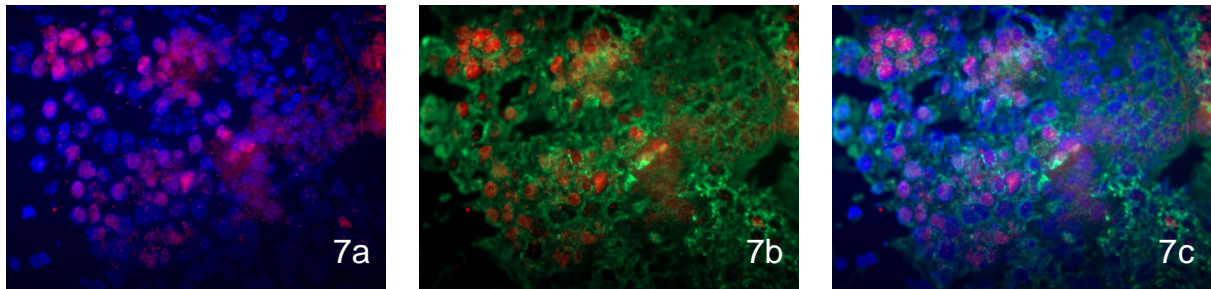


**Abb. 6k:** Zusammenfassung der Färbeergebnisse (IRS scores) der immunhistochemischen Lokalisation von Leptin in den Drüsenzellkernen in der normalen Schwangerschaft, bei Aborten und Blasemolenschwangerschaften im ersten Trimester in VT und EVT. (Mittelwerte + SD) ( $p < 0.05$  signifikant)

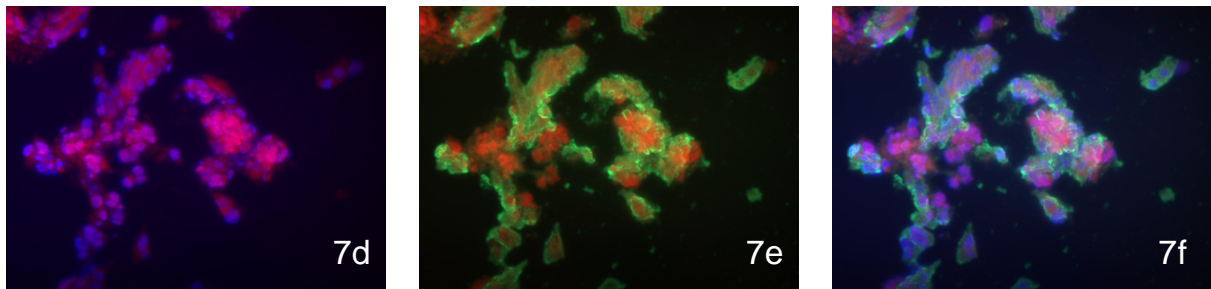
Um die EVT Herkunft von  $\text{PPAR}_{\gamma}$ ,  $\text{PPAR}_{\beta/\delta}$  und Leptin exprimierenden Zellen aus der fetomaternalen Grenzfläche zu bestätigen, wurden Immunfluoreszenz Doppelfärbungen mit einem Trophoblastenmarker (Cytokeratin-7) und Antikörpern gegen  $\text{PPAR}_{\gamma}$ ,  $\text{PPAR}_{\beta/\delta}$  und Leptin durchgeführt. EVT wurde mit beiden Antikörpern gefärbt (Abbildung 7).

## Ergebnisse

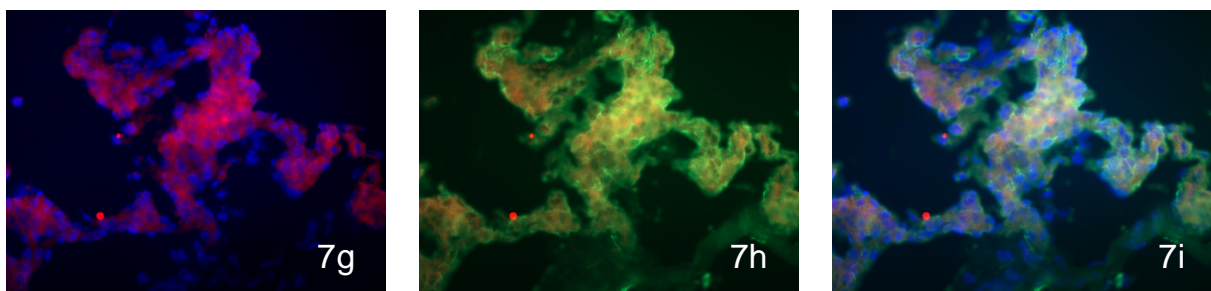
---



**Abb. 7a-c:** Immunfluoreszenz-Färbung von extravillösen Trophoblasten. Expression von PPAR $\gamma$  (7a), CK7 (7b), Triple filter excitation PPAR $\gamma$  und CK7 (7c), 40x Objektiv



**Abb. 7d-f:** Immunfluoreszenz-Färbung von extravillösen Trophoblasten. Expression von PPAR $\beta/\delta$  (7d), CK7 (7e), Triple filter excitation PPAR $\beta/\delta$  und CK7 (7f), 40x Objektiv



**Abb. 7g-i:** Immunfluoreszenz-Färbung von extravillösen Trophoblastenzellzytosol. Expression von Leptin (7g), CK7 (7h), Triple filter excitation Leptin und CK7 (7i), 40x Objektiv

### **4. Diskussion**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass nukleäre Hormonrezeptoren wie PPAR $\gamma$ , PPAR $\beta/\delta$ , RXR, AIB3 sowie Leptin bei normalen Schwangerschaften im ersten Trimester ebenso exprimiert werden wie in gestörten Schwangerschaften (Abort und Blasenmole). Die Expression von PPAR $\beta/\delta$ , RXR und AIB3 war signifikant erhöht in ST und EVT von Abortgewebe. Bei den Blasenmolen zeigte sich die höchste Expression von PPARs in ST und EVT, dagegen war die Expression von RXR in den ST und EVT herunterreguliert. Die Leptin Expression war am höchsten in den ST der Blasenmolen und am niedrigsten in den ST der Aborte. Zusätzlich war die Leptin Expression in Drüsengewebszellen signifikant erhöht bei Aborten im Vergleich zu normalen Schwangerschaften.

Studien an PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  knock-out Mäusen von Barak et al. zeigten keine endgültige Trophoblastdifferenzierung und placentare Vakularisation bei diesen Tieren, allerdings konnten die Mäuse nach Wiederherstellung des PPAR $\gamma$  Gens überleben (38), (48). Andere in vitro Studien bestätigten den wesentlichen Einfluss von PPAR $\gamma$  auf die Trophoblastdifferenzierung (36). Schild et al. bewiesen, dass PPAR $\gamma$  Liganden, wie zum Beispiel oxidierte Fette, zu einer  $\beta$ -hCG Produktion in menschlichen Trophoblasten führten, während Tarrade et al. zeigten, dass die Bildung von Leptin in ST von PPAR $\gamma$  reguliert wird. Weiterhin verhinderte die PPAR $\gamma$  Stimulation die Differenzierung von ST (41), (44).

In einem in vivo Modell wurde die Zytotrophoblast Einwanderung in die Plazenta durch eine dosisabhängige PPAR $\gamma$  Stimulation aufgehoben, eine Blockierung von PPAR $\gamma$  führte dagegen zu einer erhöhten Einwanderung von EVT (49), (50), (51).

Jüngste Studien an humanen Plazenten deckten auf, dass PPAR $\gamma$  überwiegend in den ST und EVT exprimiert wird (52). Dies wurde durch unsere Untersuchungen bestätigt. Möglicherweise sind die Expression von PPARs und die seiner Koaktivatoren RXR und AIB3 in EVT mit einer Störung der trophoblastären Zelleinwanderung und somit an der Pathophysiologie der Fehlgeburt beteiligt.

## Diskussion

---

Dunn-Albanese et al. sowie Berry et al. konnten eine erhöhte Expression von PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  in Plazenten des III. Trimesters (Dezidua) während den Wehen nachweisen, die PPAR $\gamma$  Expression in den fetalen Membranen dagegen nahm nach dem ersten Einsetzen der Wehen signifikant ab (52), (53). Unsere Untersuchungen zeigten keine signifikanten Veränderungen in der Expression von PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  während des ersten Trimesters einer normalen Schwangerschaft (6-12 SSW). Waite et al. beschrieben eine Erhöhung der PPAR $\gamma$  Aktivatoren im Verlauf einer normalen Schwangerschaft, die signifikant abfiel bei Frauen mit einer Präeklampsie, schon Wochen vor Beginn der ersten Symptome (54). In unserer Studie fanden wir eine erhöhte Expression von PPARs und RXR im Kern von EVT. Möglicherweise sind in nicht differenzierten EVT antiinflammatorische Effekte von nukleären Hormonrezeptoren am Prozess der Fehlgeburt mitbeteiligt (3).

Leptin wurde als ein aus den Fettzellen abgeleitetes Protein identifiziert, und ist an der Regulierung der Sättigung und des Energiehaushalts beteiligt. Nahezu 50% des zirkulierenden Leptins ist an Plasmaproteine gebunden, was zum aktuellen Plasma Leptinlevel beiträgt (55), (56). Leptin wird von verschiedenen Organen einschließlich der Plazenta gebildet, besonders in den ST und EVT (57). Seine Produktion ist hochreguliert während der normalen Schwangerschaft. Die Leptinexpression wird reguliert von einer Vielzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen einschließlich Östrogenen (Hochregulierung) und Androgenen (Runterregulierung) (58). Proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  und IL-1 könnten ebenso eine direkte Leptinexpression bewirken (8).

Humanes plazentares Leptin ist identisch mit Leptin aus Fettzellen und löst eine HCG Produktion in den Trophoblastzellen aus (58). Bei Patientinnen mit einer Präeklampsie zeigte sich eine Erhöhung der plazentaren Leptinproduktion, dabei trat aber nur eine niedrige Leptinkonzentration in der Nabelschnur auf. Dagegen zeigte sich bei Blasenmolenschwangerschaften ein mütterlicher Leptinmangel bei einer gleichzeitigen verstärkten plazentaren Produktion (55).

## Diskussion

---

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass in normalen und gestörten Schwangerschaften möglicherweise eine Regulierung von Leptin durch nukleäre Hormonrezeptoren wie PPARs und seinen Koaktivatoren stattfindet.

Cabrero et al. beschrieben eine leptinabhängige Herunterregulierung von PPAR $\gamma$  mRNA Spiegeln in menschlichen Monozyten (57). Castellucci et al. spekulierten, dass Leptin eine Funktion im Einwanderungsprozess der EVT haben könnte, indem es die Expression von Matrix-Metalloproteinasen reguliert (58). Muhlhauser et al. waren in der Lage zu beweisen, dass eine gute mütterliche Ernährung die Expression von PPARs, Adiponectin und Leptin mRNA im mütterlichen Fettgewebe vor der Geburt stimulieren (59). Ein schlechter Ernährungszustand gemessen am niedrigen mütterlichen Gewicht und niedrigen Hämatokrit vor der Schwangerschaft sind in Zusammenhang gebracht worden mit einem ungünstigen Schwangerschaftsverlauf (60). Deshalb könnte die Regulation und Expression der Gene, die für Fettleibigkeit verantwortlich sind, von einer gestörten oder erfolgreichen Schwangerschaft begleitet sein.

Es gibt widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Leptinspiegel im Plasma bei Frauen mit wiederholten Fehlgeburten (45), (46), (56), (61). Wir sahen signifikante Unterschiede in der Expression von Leptin in ST und Drüsengewebezellen im Abortgewebe im Vergleich zu normalen Schwangerschaften. Die Leptin Expression war erniedrigt in ST und erhöht in Drüsengewebszellen bei Aborten. Unterschiede in der Expression von Leptin im Plazentagewebe könnten die Variation der Leptin Plasmakonzentration erklären. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Leptin Expression signifikant erhöht ist in Trophoblastzellen von Blasenmolen. Dies bestätigt frühere Untersuchungen (62).

In unserer Studie erlangten wir Erkenntnisse über die Expression von Leptin und PPARs und Koaktivatoren in normalen und gestörten Schwangerschaften, besonders bei Fehlgeburten. Dennoch ist der Einfluss von Leptin und PPARs auf das Abortgeschehen noch unvollständig geklärt und benötigt weitere in vivo und in vitro Studien.



## **5. Zusammenfassung**

Jüngste Studien heben die Interaktion zwischen Leptin und PPARs hervor. Die PPAR Koaktivatoren RXR und AIB3 scheinen ebenfalls an der Leptin Regulation in der Plazenta beteiligt sein. Das Ziel dieser Studie war es, die Häufigkeit und die Verteilung der Expression von PPAR, RXR, AIB3 und Leptin in normalen menschlichen Schwangerschaften im ersten Trimester mit gestörten Schwangerschaften wie Fehlgeburten und Blasenmolen zu vergleichen. Die Expression von PPAR $\gamma$  und  $\beta/\delta$ , RXR, AIB3 und Leptin wurde durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen. Eine erhöhte Expression von PPAR $\beta/\delta$ , RXR und AIB3 wurde in den EVT und ST von Aborten festgestellt. Bei Blasenmolen wurde eine erhöhte Expression von PPAR $\gamma$  und PPAR $\beta/\delta$  in EVT und ST beobachtet, demgegenüber war RXR signifikant herunterreguliert in EVT und ST. Die Leptin Expression in ST war am niedrigsten bei Fehlgeburten und am höchsten bei Blasenmolen. Im Gegensatz zu trophoblastärem Gewebe, war die Expression von Leptin in Drüsenepithelzellen der Dezidua bei Fehlgeburten erhöht.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine signifikant erniedrigte Leptin Expression begleitet ist von einer verstärkten Expression von PPAR $\beta/\delta$  und RXR in ST von Abortplazenten. Dies bestätigt bekannte regulatorische Mechanismen von PPAR, RXR und Leptin. Dennoch zeigte sich bei Blasenmolenschwangerschaften eine Hochregulierung des Leptins und eine erhöhte Expression von PPARs in ST. Andererseits wurde RXR herunterreguliert in ST von Blasenmolen, welches eine Interaktion von RXR und Leptin bei Blasenmolen andeutet. Obwohl PPAR $\beta/\delta$  und RXR hochreguliert werden in EVT von Aborten, zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Expression von Leptin. AIB3 als Koaktivator von PPARs wies lediglich signifikante Veränderungen in ST von Aborten auf im Vergleich zu normalen Schwangerschaften und hat demzufolge weniger Einfluss auf die Leptin Regulation.

Eine signifikante Hochregulation von Leptin in Abortdeziduen, welches gleichzeitig begleitet wird von einer erniedrigten Leptin Expression in ST, könnte die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des peripheren Leptinspiegels im mütterlichen Serum aus früheren Studien miterklären.

## Literaturverzeichnis:

1. Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. Lancet 2006; **368**(9535):601-11.
2. Regan L, Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2000; **14**(5):839-54.
3. Toth B, Hornung D, Scholz C, Djalali S, Friese K, Jeschke U. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: New Players in the Field of Reproduction. Am J Reprod Immunol 2007; **58**(3):289-310.
4. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. Cell 1994;**79**(7):1147-56.
5. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature 1998;**391**(6662):82-6.
6. Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. J Leukoc Biol 1999;**66**(5):733-9.
7. Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of leptin and obesity: a HuGE review. Am J Epidemiol 2005;**162**(2):101-14.
8. Lappas M, Permezel M, Rice GE. Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. Endocrinology 2005;**146**(8):3334-42.
9. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. Inflamm Res 2000;**49**(10):497-505.
10. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletscher JA, Fletscher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome-proliferated receptor gamma and the retinoid X receptor. Proc Natl Acad Sci USA 1997; **94**:237-41
11. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletscher C, Singer S, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. Mol Cell 1998;**1**:465-70

## Literaturverzeichnis

---

12. Hashimoto Y, Shimada Y, Itami A, Ito, Kawamura J, Kawabe, Kaganoi J, Maeda M, Watanabe G, Imamura M. Growth Inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2003;**39**:2239-46
13. Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human. Pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2000;**60**:5558-64.
14. Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kohgo Y. Aktivation of PPAR gamma inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 1999;**455**:135-9.
15. Nakashiro K, Begum NM, Uchida D, Kawamata H, Shintani S, Sato M, Hamakawa H. Thiazolidinediones inhibit cell growth of human oral squamous cell carcinoma in vitro independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Oral Oncol* 2003;**39**:855-61
16. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR gamma dependent and independent effect on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat med* 2001;**7**:48-52
17. Place AE, Suh N, Williams CR, Risingsong R, Honda T, Honda Y, Gribble GW, Leesnitzer LM, Stimmel JB, Willson TM, Rosen E, Sporn MB. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolide, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res* 2003;**9**:2798-806
18. Stauber M, Weyerstahl T, Gynäkologie und Geburtshilfe, Duale Reihe 2005: **480-486**
19. Griebel, C. P., J. Halvorsen, et al. (2005). "Management of spontaneous abortion." Am Fam Physician **72**(7): 1243-50.
20. Haag, P., N. Hanhart, et al. (2003). Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis. Breisach am Rhein, Medizinische Verlags- und Informationsdienste: pp. **47, 115-120**.
21. Jeffers, M. D., P. O'Dwyer, et al. (1993). "Partial hydatidiform mole: a common but underdiagnosed condition. A 3-year retrospective clinicopathological and DNA flow cytometric analysis." Int J Gynecol Pathol **12**(4): 315-23.
22. Berkowitz, R. S., D. P. Goldstein, et al. (1985). "Natural history of partial molar pregnancy." Obstet Gynecol **66**(5): 677-81.
23. Seckl, M. J., R. A. Fisher, et al. (2000). "Choriocarcinoma and partial hydatidiform moles." Lancet **356**(9223): 36-9.

## Literaturverzeichnis

---

24. Garner, E. I., D. P. Goldstein, et al. (2007). "Gestational trophoblastic disease." Clin Obstet Gynecol **50**(1): 112-22.
25. Palmer, J. R. (1994). "Advances in the epidemiology of gestational trophoblastic disease." J Reprod Med **39**(3): 155-62.
26. Desoye, G., M. Hartmann, et al. (1997). "Location of insulin receptors in the placenta and its progenitor tissues." Microsc Res Tech **38**(1-2): 63-75.
27. Kingdom, J., B. Huppertz, et al. (2000). "Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **92**(1): 35-43.
28. Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-4.
29. Pfleiderer A [Milestones in Gynecological Oncology over the Last 20 Years] Onkologie 2000 Dec; **23**(6):615-618.
30. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Charnbon P, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell 1995; **83**:835-9
31. Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor – gamma: a versatile metabolic regulator. Ann Med. 1999; **31**:343-351.
32. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. Nature. 1992; **358**:771-774.
33. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue Distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor – alpha in humans. Diabetes. 1997; **46**: 1319 – 1327
34. Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. Mutat Res. 2000; **448**:121-138
35. Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, Evain-Brion D. Involvement of PPARgamma in Human Trophoblast Invasion. Placenta 2007.
36. Schaiff WT, Barak Y, Sadovsky Y. The pleiotropic function of PPAR gamma in the placenta. Mol Cell Endocrinol 2006; **249**(1-2):10-5.

## Literaturverzeichnis

---

37. Kuang SQ, Liao L, Zhang H, Pereira FA, Yuan Y, DeMayo FJ, et al. Deletion of the cancer-amplified coactivator AIB3 results in defective placentation and embryonic lethality. J Biol Chem 2002; **277**(47):45356-60.
38. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Mol Cell 1999; **4**(4):585-95.
39. Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. PPARs and the placenta. Placenta 2007; **28**(2-3):65-76.
40. Wendling O, Chambon P, Mark M. Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; **96**(2):547-51.
41. Tarrade A, Lai Kuen R, Malassine A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, et al. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. Lab Invest 2001; **81**(9):1199-211.
42. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Pineda Torra I, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. J Biol Chem. 1998; **273**(40):25573-25580.
43. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994 Dec 1; **372**(6505):425-32. Erratum in: Nature 1995 Mar 30; **374**(6521):479.
44. Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, et al. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. J Clin Endocrinol Metab 2001; **86**(10):5017-24.
45. Laird SM, Quinton ND, Anstie B, Li TC, Blakemore AI. Leptin and leptin-binding activity in women with recurrent miscarriage: correlation with pregnancy outcome. Hum Reprod 2001; **16**(9):2008-13.
46. Tommaselli GA, Di Spiezio Sardo A, Di Carlo C, Bifulco G, Cerrota G, Cirillo D, et al. Do serum leptin levels have a role in the prediction of pregnancy outcome in case of threatened miscarriage? Clin Endocrinol (Oxf) 2006; **65**(6):772-5.
47. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. Pathologe 1987; **8**(3):138-40.
48. Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; **99**(1):303-8.

## Literaturverzeichnis

---

49. Wang Q, Fujii H, Knipp GT. Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas. Placenta 2002; **23**(8-9):661-71.
50. Schaiff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. J Clin Endocrinol Metab 2000; **85**(10):3874-81.
51. Rodie VA, Young A, Jordan F, Sattar N, Greer IA, Freeman DJ. Human placental peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma expression in healthy pregnancy and in preeclampsia and intrauterine growth restriction. J Soc Gynecol Investig 2005; **12**(5):320-9.
52. Dunn-Albanese LR, Ackerman WEt, Xie Y, Iams JD, Kniss DA. Reciprocal expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and cyclooxygenase-2 in human term parturition. Am J Obstet Gynecol 2004; **190**(3):809-16.
53. Berry EB, Eykholt R, Helliwell RJ, Gilmour RS, Mitchell MD, Marvin KW. Peroxisome proliferator-activated receptor isoform expression changes in human gestational tissues with labor at term. Mol Pharmacol 2003; **64**(6):1586-90.
54. Waite LL, Louie RE, Taylor RN. Circulating activators of peroxisome proliferator-activated receptors are reduced in preeclamptic pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 2005; **90**(2):620-6.
55. Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2006; **194**(6):1537-45.
56. Lepercq J, Hauguel De Mouzo S. [Leptin during pregnancy]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2002; **31**(2 Pt 1):167-72.
57. Cabrero A, Cubero M, Llaverías G, Alegret M, Sánchez R, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Leptin down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) mRNA levels in primary human monocyte-derived macrophages. Mol Cell Biochem. 2005 Jul; **275**(1-2):173-9.
58. Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurro V, Islami D, et al. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. Mol Hum Reprod 2000; **6**(10):951-8.
59. Muhlhausler BS, Duffield JA, McMillen IC. Increased maternal nutrition stimulates peroxisome proliferator activated receptor-gamma, adiponectin, and leptin messenger ribonucleic acid expression in adipose tissue before birth. Endocrinology 2007; **148**(2):878-85.

## Literaturverzeichnis

---

60. El-Bastawissi AY, Peters R, Sasseen K, Bell T, Manolopoulos R. Effect of the Washington Special Supplemental Nutrition Program for Women, Infants and Children (WIC) on Pregnancy Outcomes. Matern Child Health J 2007.
61. Lage M, Garcia-Mayor RV, Tome MA, Cordido F, Valle-Inclan F, Considine RV, et al. Serum leptin levels in women throughout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion. Clin Endocrinol (Oxf) 1999; **50**(2):211-6
62. Li RH, Yu MM, Cheung AN, Wong YF. Expression of leptin and leptin receptors in gestational trophoblastic diseases. Gynecol Oncol 2004; **95**(2):299-306.
63. Berkowitz, R. S., D. W. Cramer, et al. (1985). "Risk factors for complete molar pregnancy from a case-control study." Am J Obstet Gynecol **152**(8): 1016-20.
64. Brockmann JA, Gupta RA, Dubois RN. Aktivation of PPAR gamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cels. Gastroenterology 1998; **115**:1049-55
65. Brown, H. (2007). "Abortion round the world." Bmj **335**(7628): 1018-9.
66. Chardonens, D., P. Cameo, et al. (1999). "Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion." Mol Hum Reprod **5**(11): 1077-82.
67. Considine RV. Regulation of leptin production. Rev Endocr Metab Disord 2001; **2**(4):357-63.
68. Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Sintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. Proc Natl Acad Sci USA 1998; **95**:8806-11
69. Forbes, K. and M. Westwood (2008). "The IGF axis and placental function. a mini review." Horm Res **69**(3): 129-37.
70. Hustin, J., E. Jauniaux, et al. (1990). "Histological study of the materno-embryonic interface in spontaneous abortion." Placenta **11**(6): 477-86.
71. Hustin, J. and J. P. Schaaps (1987). "Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy." Am J Obstet Gynecol **157**(1): 162-8.
72. Jaffe, R., E. Jauniaux, et al. (1997). "Maternal circulation in the first-trimester human placenta—myth or reality?" Am J Obstet Gynecol **176**(3): 695-705.

## Literaturverzeichnis

---

73. Jauniaux, E., J. Hempstock, et al. (2003). "Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies." Am J Pathol **162**(1): 115-25.
74. Jauniaux, E., D. Jurkovic, et al. (1991). "In vivo investigations of the anatomy and the physiology of early human placental circulations." Ultrasound Obstet Gynecol **1**(6): 435-45.
75. Kliman, H. J., J. E. Nestler, et al. (1986). "Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae." Endocrinology **118**(4): 1567-82.
76. Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. Cancer Res 1998; **58**:3344-52.
77. Kurjak, A. and S. Kupesic (1997). "Doppler assessment of the intervillous blood flow in normal and abnormal early pregnancy." Obstet Gynecol **89**(2): 252-6.
78. Levebre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. Nat Med 1998; **4**:1053-7.
79. Lyall, F., J. N. Bulmer, et al. (1999). "Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide." Am J Pathol **154**(4): 1105-14.
80. Rodesch, F., P. Simon, et al. (1992). "Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy." Obstet Gynecol **80**(2): 283-5.
81. Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, Deangelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletscher C, Spiegelmann BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR gamma. Nat med 1998; **4**:1046-52
82. Sasaki, R., S. Masuda, et al. (2000). "Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis." Biosci Biotechnol Biochem **64**(9): 1775-93.
83. Schild RL, Schaiff WT, Carlson MG, Cronbach EJ, Nelson DM, Sadovsky Y. The activity of PPAR gamma in primary human trophoblasts is enhanced by oxidized lipids. J Clin Endocrinol Metab 2002; **87**(3):1105-10.



**Aus dieser Dissertation gehen folgende Publikationen hervor.**

1. Toth B, Bastug M et al. (2008). Leptin and peroxisome proliferator-activated receptors: impact on normal and disturbed first trimester human pregnancy. *Histol Histopathol.* 2008 Dec;**23** (12):1465-75.
2. Toth B, Bastug M et al. (2009). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in normal human pregnancy and miscarriage. *Acta Histochem.* 2009;**111** (4):372-8. Epub 2009 Apr 1.

## **Danksagung**

Für das interessante Thema und für die zahlreichen Anregungen möchte ich mich bei meinen Betreuern Frau PD Dr. med. Bettina Toth sowie Herrn PD Dr. Udo Jeschke ganz herzlich bedanken.

Ihr Interesse am Fortgang der Arbeit, Ihre einfühlsame und geduldige Unterstützung haben wesentlich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Susanne Kunze möchte ich für Ihre stete Hilfsbereitschaft und Ihre ausgesprochen freundliche Art danken.

Außerdem möchte ich mich noch ganz herzlich bei folgenden Personen bedanken.

Christina Kuhn

Sandra Schulze

Karin Roth

Isabelle Fischer

Johanna Rauch

Christine Dannenmann

Laura Sousa

und allen weiteren Mitarbeitern im Immunhistochemischen Labor in der Maistrasse für ihre große Unterstützung.

## **Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten:**

Name	Mehmet Bastug
Geburtsdatum	12. September 1979
Geburtsort	Starnberg
Anschrift	Theresienstr. 144, 80333 München

### **Schullaufbahn:**

09/1985 – 07/1989	Grundschule Feldafing
09/1989 – 07/1998	Neusprachliches Gymnasium Tutzing
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### **Wehrdienst:**

09/1998 – 06/2002	Zeitsoldat im Sanitätsdienst der Fernmelde- und Fachschule des Heeres für Elektrotechnik in Feldafing mit Ausbildung zum Krankenpflegehelfer und Rettungssanitäter
-------------------	--

### **Studium:**

09/2002 – 09/2004	Vorklinik des Studiums der Medizin Ludwig-Maximilian-Universität München Abschluss: Ärztliche Vorprüfung
10/2004 – 07/2007	Klinischer Abschnitt des Studiums der Medizin Ludwig-Maximilian-Universität München
08/2007 – 07/2008	Praktisches Jahr 1. Tertial: Klinikum Starnberg, Abteilung: Chirurgie 2. Tertial: Klinikum Neuperlach und Royal North Shore Hospital, Sydney Australien, Abteilung: Innere Medizin 3. Tertial: Klinikum Starnberg, Abteilung: Gynäkologie und Geburtshilfe
11/2008	Staatsexamen
seit 01/2009	Assistenzarzt im Klinikum Starnberg, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe

München den 12.10.2009  
Mehmet Bastug